

III. METODE PENELITIAN

1.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Ilmu dan Teknologi pangan Universitas Muhammadiyah Malang. Kegiatan ini dimulai pada bulan Februari 2018 sampai bulan April 2018.

1.2 Alat dan Bahan

1.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada pembuatan *water kefir* apel adalah sendok, pisau, timbangan digital (*camry* model: EK5055), pengaduk, panci, kompor, botol kaca, kain saring, dan saringan. Alat-alat yang digunakan untuk analisa adalah seperangkat alat kaca (*glassware* IWAKI PYREX), *Autoclave*, *petridish*, *colony counter*, lemari asam, *laminary air flow*, *hot plate*, *beaker glass*, *erlenmeyer*, incubator merk mmm iluminer, timbangan analitik merk GR-200, jarum ose, bunsen, tabung reaksi, gelas ukur, oven, buret plastik, pipet ukur, pipet tetes, *vortex*, botol vial, desikator, pH meter, corong, kertas saring, kertas label, kapas, *tissue*.

1.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada pembuatan *water kefir* apel adalah apel *rome beauty* umur panen 5 bulan yang didapat dari toko buah “*Fresh Everyday*” Tlogomas Malang, air, *kefir grain* yang dibeli dari Jakarta Selatan, gula sukrosa (gula pasir) yang dibeli dari toko Avia Malang, gula merah yang dibeli dari pasar Purwosari, dan gula fruktosa (jagung) yang dibeli dari toko Prima Rasa Malang. Bahan-bahan kimia yang digunakan untuk analisa apel *kefir* adalah Akuades,

NaOH 0,1 N, indikator PP (*Fenolftalein*), amilum, natrium thiosulfat, KI, H₂SO₄, Luff Schoorl, MRS agar dan PDA (*potato dextrose agar* 39g/lt).

1.3 Metodologi Penelitian

Penelitian ini terdiri dari satu tahapan yaitu proses fermentasi *water kefir* apel. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) Faktorial, yang terdiri atas dua faktor. Faktor I adalah variasi jenis gula yang digunakan dengan 3 level (Sukrosa, gula merah, dan fruktosa). Faktor II adalah variasi penambahan konsentrasi *kefir grain* dengan 3 level (3%, 6%, 9%).

Faktor I: Variasi Jenis Gula (M)

M1: Gula Sukrosa (Gula Pasir) 10% b/v

M2: Gula Merah 10% b/v

M3: Gula Fruktosa 10% v/v

Faktor II: Variasi Penambahan Konsentrasi *Kefir Grain* (A)

A1: Konsentrasi *Kefir Grain* 3% (b/v)

A2: Konsentrasi *Kefir Grain* 6% (b/v)

A3: Konsentrasi *Kefir Grain* 9% (b/v)

Variasi Jenis Gula (M)	Variasi Pembahan Konsentrasi <i>Kefir Grain</i>		
	A1	A2	A3
Kontrol			
M1	M1A1	M1A2	M1A3
M2	M2A1	M2A2	M2A3
M3	M3A1	M3A2	M3A3

Keterangan:

M1A1: Gula Sukrosa (Gula Pasir) dan Penambahan Konsentrasi *Kefir grain* 3%

M1A2: Gula Sukrosa (Gula Pasir) dan Penambahan Konsentrasi *Kefir grain* 6%

M1A3: Gula Sukrosa (Gula Pasir) dan Penambahan Konsentrasi *Kefir grain* 9%

M2A1: Gula Merah dan Penambahan Konsentrasi *Kefir grain* 3%

M2A2: Gula Merah dan Penambahan Konsentrasi *Kefir grain* 6%

M2A3: Gula Merah dan Penambahan Konsentrasi *Kefir grain* 9%

M3A1: Gula Fruktosa (Jagung) dan Penambahan Konsentrasi *Kefir grain* 3%

M3A2: Gula Fruktosa (Jagung) dan Penambahan Konsentrasi *Kefir grain* 6%

M3A3: Gula Fruktosa (Jagung) dan Penambahan Konsentrasi *Kefir grain* 9%

1.4 Pelaksanaan Penelitian

1.4.1 Pembuatan Sari Apel (Aprillia dan Wahono, 2014)

Buah apel disortir dan dibersihkan kemudian di potong dadu. Setelah itu diblanching selama 5 menit untuk mencegah terjadinya browning kemudian diblender dengan perbandingan buah dan air 1:5 dan disaring menggunakan kain saring. Filtrat tersebut direbus selama 15 menit, lalu didiamkan selama 10 menit hingga tidak terlalu panas dan dimasukkan kedalam wadah/botol. Diagram Alir Proses Pembuatan Sari Apel dapat dilihat pada Gambar 3. (Aprilia dan Wahono, 2014).

1.4.2 Pembuatan *Water Kefir* Apel

Sari apel yang dihasilkan selanjutnya dicampurkan dengan gula merah/ gula sukrosa/ gula fruktosa (10%b/v) dan juga *grain kefir* (3%, 6%, dan 9% b/v) kemudian dilakukan pengemasan yang selanjutnya difermentasi pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian dilakukan penyaringan *water kefir* apel, selanjutnya

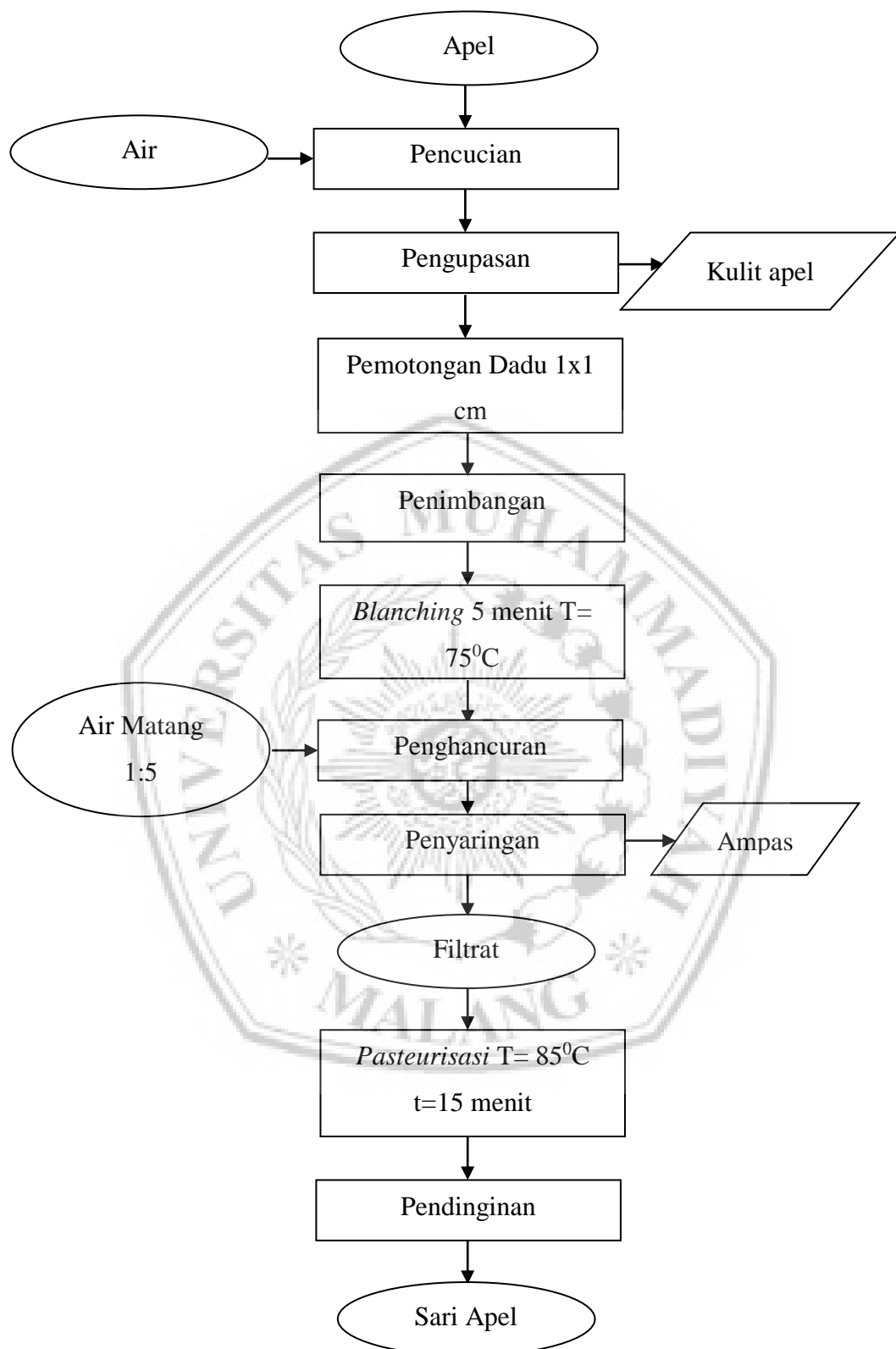
dilakukan analisa kadar air, uji pH, total asam tertitrasi, uji alkohol, uji total BAL, uji total *yeast*, dan uji organoleptik meliputi: aroma, kenampakan, dan kesukaan. Diagram Alir Pembuatan *Kefir* Apel dapat dilihat pada Gambar 4 (Rahmah,2016).

1.5 Parameter Pengamatan

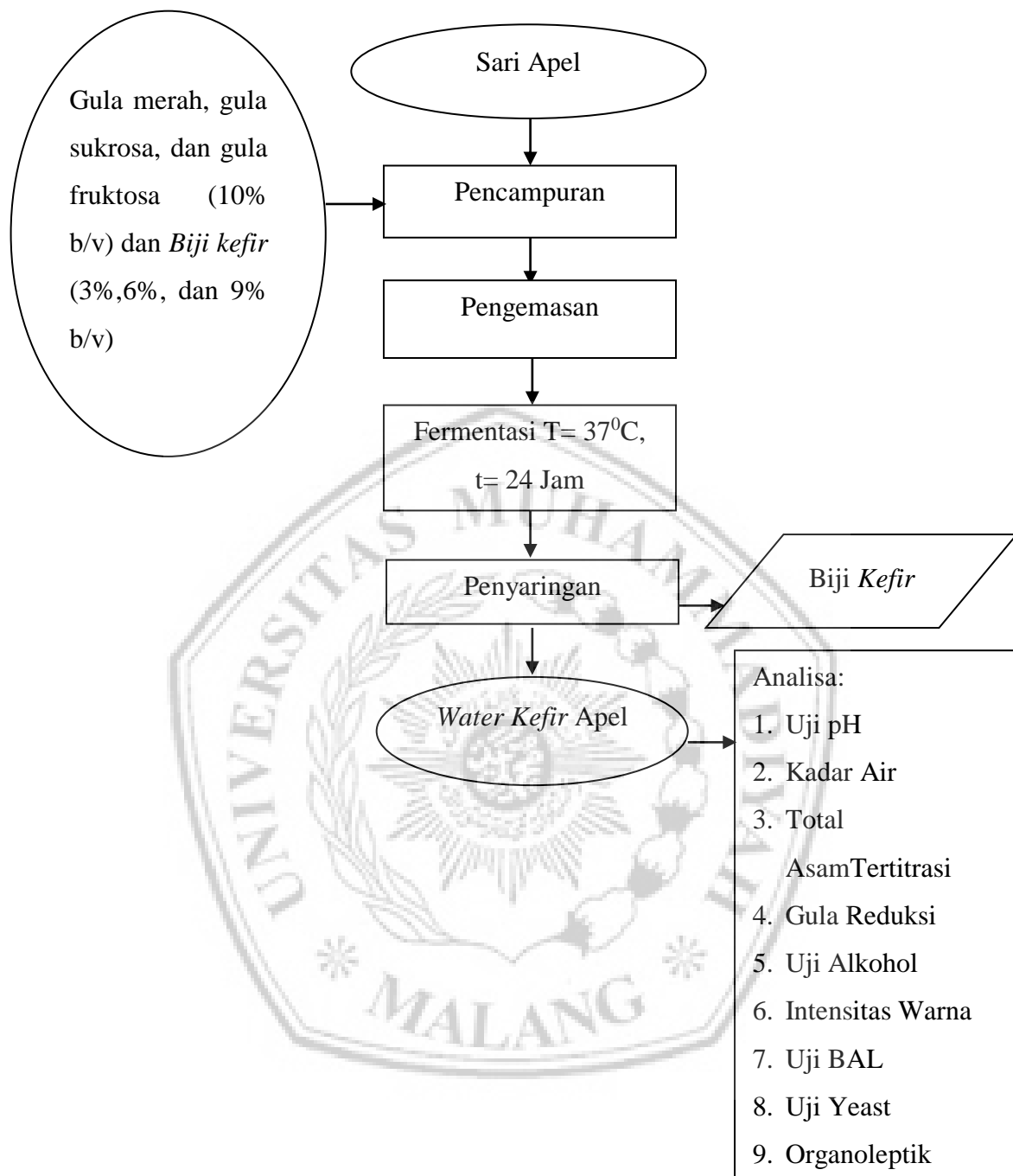
Adapun parameter pengamatan yang dilakukan pada penelitian kajian perbedaan sumber gula dan konsentarsi *grain kefir* terhadap sifat fisikokimia dan organoleptik *kefir* apel, yaitu: Uji pH, Uji Kadar Air, Total Asam Tertitrasi, Uji Gula Reduksi, Uji Intensitas Warna, Uji Alkohol, Uji Total BAL, Uji Total Yeast, dan Uji Organoleptik yang meliputi: aroma, kenampakan, dan kesukaan.

3.5.1 Uji pH (Badan Standarisasi Nasional, 2004)

1. Menyalakan pH meter;
2. Membilas elektroda dan *temperature prob* menggunakan akuades dan mengeringkannya;
3. Melakukan kalibrasi dengan mencelupkan elektroda pada larutan penyangga (pH 7) serta asam (pH 4) dan membersihkannya;
4. Membilas kembali elektroda menggunakan akuades dan mengeringkan;
5. Mencelupkan elektroda pada sampel, dengan menekan tombol *Ar (hold)* dan *Enter* kemudian menunggu pembacaan pada layar stabil serta muncul *indicator autolock* pada layar;
6. Mencatat nilai yang tertera pada layar digital.



Gambar 1. Diagram Alir Proses Pembuatan Sari Apel (Aprillia dan Wahono, 2014)



Gambar 2. Diagram Alir Proses Pembuatan *Kefir* Apel (Rahmah, 2016)

3.5.2 Uji Kadar Air (AOAC, 2005)

1. Mengeringkan kurs porselen yang akan digunakan dalam oven selama 24 jam dengan suhu 100-105⁰C;
2. Mendinginkan kurs porselen dalam desikator selama 15 menit;

3. Menimbang kurs porselen sebagai berat botol (A);
4. Menimbang bahan sebanyak 2 gram ke dalam kurs porselen yang telah dikeringkan, dan dicatat sebagai berat bahan dalam cawan (B);
5. Mengeringkan sampel dalam oven pada suhu 100-105⁰C selama 5 jam;
6. Mendinginkan sampel dalam desikator selama 15 menit;
7. Menimbang kembali sampel sebagai bobot akhir sampel (C);
8. Menghitung kadar air sampel dengan rumus:

$$\text{Kadar Air (\%)} = \frac{B-C}{B-A} \times 100\%$$

3.5.3 Total Asam Tertitrasi (AOAC, 1995)

1. 10 g sampel dimasukkan kedalam labu ukur 100 ml, kemudian ditambahkan akuades sampai tanda batas, selanjutnya dihomogenkan dan disaring;
2. Filtrat diambil 10 ml dan dimasukkan kedalam *Erlenmeyer*, tambahkan 2- 3 tetes indicator PP (*Fenolftalein*);
3. Titrasi dengan larutan NaOH 0,10 N hingga warna larutan berubah menjadi merah muda dan warna tersebut tidak berubah kembali selama 30 detik;
4. Hitung jumlah NaOH yang digunakan.

3.5.4 Uji Gula Reduksi Metode *Luff Schoorl* (AOAC, 1997 yang disitasi oleh Sudarmadji dkk. (1997))

1. Menimbang bahan 2 gram dengan timbangan analitik;
2. Menambahkan akuades sebanyak 25 ml pada labu takar 25 ml sampai batas tera dan menghomogenkan;
3. Menyaring sampel dengan kertas saring;

4. Mengambil filtrat 12,5 ml dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 ml, menambahkan 12,5 ml Luff Schoorl. Membuat blanko yaitu 12,5 ml larutan Luff Schoorl dan 12,5 ml akuades;
5. Mendidihkan pada *hot plate* dan pendingin balik, pertahankan 10 menit setelah mendidih;
6. Mendinginkan dengan cepat pada air mengalir;
7. Menambahkan 7,5 ml larutan KI dan homogenkan;
8. Menambahkan 12,5 ml H_2SO_4 dan menambahkan 5 tetes amilum dan homogenkan;
9. Mentitrasi dengan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N sampai berwarna putih keruh dan catat volume titrasi;
10. Menghitung Kadar Gula Reduksi dengan rumus:

$$\Delta \text{ ml Sampel} = \text{ml Blanko} - \text{ml Sampel}$$

$$\text{Mg Glukosa} = \text{Kadar Glukosa pada Tabel} + \Delta(\text{Sisa. } \Delta)$$

$$\text{Kadar Gured (\%)} = \frac{\text{mg Glukosa} \times \text{FP}}{\text{Berat Bahan (mg)}} \times 100$$

3.5.5 Uji Intensitas Warna (Anita, 2013)

1. Mengaktifkan *color reader* dengan menekan tombol on;
2. Mengawali pengukuran dengan standarisasi alat menggunakan keramik standar yang memiliki nilai L, a dan b dimana L adalah kecerahan, nilai positif berarti cerah nilai negatif berarti suram, a adalah kemerahan nilai positif berarti merah nilai negatif berarti hijau, b adalah kekuningan nilai positif berarti kuning dan nilai negatif berarti biru;
3. Menempelkan ujung lensa alat pada permukaan sampel yang akan diamati dan mengukur warnanya tekan tombol target;

4. Mencatat hasil pengukuran intensitas warna.

3.5.6 Uji Kadar Alkohol Spektrofotometri (Day, 1992)

1. Penentuan Kuva standar : digunakan ethanol dengan berbagai konsentrasi 0%, 0,3%, 0,6%, 0,12%, 0,25%, 0,5%, 1%. Masing-masing larutan standar diukur absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm;
2. Sebanyak 0,5 sampel cair, diencerkan dengan akuades 15 ml;
3. Menambahkan K_2CrO_4 sebanyak 12,5 ml. Terjadi perubahan warna menjadi jingga saat ditambahkan kalium dikromat;
4. Memanaskan campuran sampel, hal ini bertujuan agar reaksi berlangsung cepat. Setelah pemanasan, sampel berwarna hijau kehitaman;
5. Mendinginkan campuran yang telah diencerkan dan homogenkan dengan vortex, kemudian ukur absorbansi pada panjang gelombang 600 nm.
6. Menghitung kadar alkohol dalam sampel.

3.5.7 Uji Total BAL (Bakteri Asam Laktat) (Fardiaz,1992)

1. Menyiapkan seri pengenceran, tabung diisi 0,9 ml aquades steril 4 buah;
2. Dipipet 0,1 ml sampel cair (sampel padat ditimbang dan diencerkan) dan dihomogenkan pada tabung pengenceran. Kemudian diambil 10 mikron liter untuk ditanam secara *droop* (tetes) ke media MRS Agar dan diberi tanda pada bagian bawah media dalam *petri disck* dengan spidol permanen (Pengenceran 10^{-1});
3. Mengambil hasil pengenceran 0,1 ml untuk dihomogenkan dengan tabung pengenceran yang lain, diambil 10 mikron liter untuk ditanam dan 0,1 ml untuk diencerkan selajutnya, sampai pengenceran yang dikehendaki, misalnya sampai 10^{-7} ;

4. Media yang telah ditanami dibiarkan selama 10 menit, agar tetesan cairan meresap dalam media;
5. Diinkubasi selama 6 jam dalam suhu optimal posisi *Petri* disk dibalik;
6. Dilihat dengan *mikroskop gross* dan dipilih sebaran koloni yang dapat dihitung pada pengencerannya.

3.5.8 Uji Yeast (Asyikeendkk., 2012)

1. Pengambilan larutan kefir apel 1 ml masukkan kedalam tabung reaksi dan tambahkan akuades 9 ml lalu vortex, kemudian encerkan sampai pangkat 4 pengenceran.
2. Pengambilan Isolat khamir yang dihasilkan 1 ml, kemudian tanam pada medium PDA (*potato dextrose agar* 39g/l) steril;
3. Inkubasi dengan temperature suhu 25°C, 30°C dan 37°C selama 72jam;
4. Koloni yang tumbuh dihitung jumlahnya sebagai tanda adanya pertumbuhan *yeast*.

3.5.9 Uji Organoleptik (Rahayu,2001)

Analisis organoleptik dilakukan untuk mengetahui daya terima produk *kefir* apel oleh konsumen melalui beberapa parameter. Parameter yang diujikan pada uji ini adalah kesukaan terhadap rasa, aroma, dan kenampakan. Analisis organoleptik ini menggunakan metode *Hedonic Test*. Metode ini memungkinkan para panelis untuk memberikan nilai terhadap tingkat kesukaan pada masing-masing parameter. Kisaran nilai yang ada pada skala *hedonic* berkisar antara nilai 1-5 pada skala *numeric* untuk masing-masing parameter. Semakin tinggi nilai yang diberikan maka semakin tinggi pula tingkat kesukaan konsumen. Masing-masing sampel akan diberikan kode yang berbeda, untuk menghindari terjadinya

pembandingan tingkat kesukaan panelis antar sampel. Pengujian kesukaan ini menggunakan panelis yang tidak terlatih dengan jumlah minimal 20 orang.

1.6 Analisis Data

Pengolahan data pada penelitian ini menggunakan analisis ragam (ANOVA) dengan uji F pada taraf 5 %.apabila terjadi berbeda nyata atau interaksi pada masing-masing perlakuan maka data yang diperoleh akan dilanjutkan dengan uji pembeda menggunakan uji DMRT (Duncan's Multiplerange Test) dengan uji T pada taraf 5% De Garmo et al (1984).

